AKTIVITAS LIGNINOLITIK BEBERAPA JAMUR APHYLLOPHORALES DAN KEMAMPUANNYA MENDEGRADASI LIGNIN PADA LINDI HITAM

Atria Martina, Tetty Marta Linda, Delita Zul, Nila Veronika, Ratna Jelita
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau Pekanbaru

**Coressponding author: Tria_mt05@yahoo.com*

Abstract

Fourteen local isolate Aphyllophorales fungi were screened their ligninolytic activity. The isolate with highest ligninolytic activity was tested it capability to degrade kraft blackliquor lignin. The biodegradability of black liquor is low because the presence of lignin and lignin derivative in the wastewater. These fungal were screened for ligninolytic activity by decolorization on solid mediacontaining RBBR dye. The ability of the fungal strains to biodegrade kraft black liquor lignin was performed by submerged fermentation condition with agitation and incubation time as treatment. The solid culture result in 3 isolates had ligninolytic activity and Ganoderma sp.BTA1 gave the highest ligninolytic. Agitation and incubation time influenced ligninbiodegradation of blackliquor significantly. Optimum condition for lignin biodegradation was at 200 rpm during 25 days with lignin reduction was 45,786%.

Keywords: *Ganoderma sp. BTA1, lignin, black liquor, biodegradation*

PENDAHULUAN

Industri *pulp* dan kertas merupakan salah satu sektor industri yang memberi kontribusi utama polusi di dunia. Dua pabrik kertas yang terbesar di Indonesia beroperasi di Riau. Menurut Sumathi dan Hung (2006); Font *et al*., (2003), proses pembuatan *pulp* secara kimia menghasilkan limbah berupa lindi hitam. Lindi hitam terutama mengandung lignin terlarut dan derivatnya yang memberikan warna hitam kecoklatan.

Lignin merupakan polimer yang strukturnya heterogen dan kompleks yang terdiri dari koniferil alkohol, sinapil alkohol dan kumaril alkohol (Singh, 2006). Dekomposisi lignin berlangsung sangat lambat di lingkungan karena struktur kimia-nya yang komplek, heterogen, tidak larut dalam air dan aromatic (Tuomela, 2002; Erden *et al*., 2009). Secara alamiah lignin sukar didegradasi dan hanya sedikit mikroorganisme yang mampu mendegradasinya.

Beberapa kelompok jamur pelapuk putih Basidiomycota diketahui mampu mendegradasi lignin dengan efisien (Dashtban *et al.*, 2010). Jamur dapat mendegradasi lignin karena mampu mensintesis enzim ligninase. Kelompok jamur pelapuk putih menghasilkan enzim ligninolitik ekstraseluler yaitu: lakase (Lac) dandua peroksidase: *Mn dependent peroxidase* (MnP), *versatile peroxidase* (VP) yang mampu mendegradasi lignin (Sivakumar *et al*., 2010). Mikroba ligninolitik yang efisien mampu mendegradasi molekul organik rekalsitran dan komplek seperti senyawa senobiotik (Tuomela, 2002; Kausik & Malik, 2009; Song *et al*., 2010).

Industri *pulp* dan kertas merupakan salah satu sektor industri yang memberi kontribusi utama polusi di dunia. Dua pabrik kertas yang terbesar di Indonesia beroperasi di Riau. Menurut Sumathi dan Hung (2006); Font *et al*., (2003), proses pembuatan pulp secara kimia menghasilkan limbah berupa lindi hitam. Lindi hitam terutama mengandung lignin terlarut dan derivatnya yang memberikan warna hitam kecoklatan.

Proses biodegradasi lignin dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain agitasi dan waktu inkubasi. Menurut Hossain dan Antharaman (2006), peningkatan kecepatan agitasi dan penambahan waktu inkubasi akan meningkatkan aktivitas tiga enzim ligninolitik (LiP, MnP dan lakase) sampai batas tertentu

namun kemudian berangsur-angsur menurun. Martina *et al*., (2004) telah meneliti kemampuan *Ganoderma*sp. mendegradasi lignin pada beberapa konsentrasi lindi hitam, namun pengaruh faktor lainnya belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan menyeleksi jamur *Aphyllophorales* isolat lokal Riau yang mempunyai aktivitas ligninolitik dan mengetahui kemampuannya dalam mendegra-dasi lignin pada lindi hitam.

MATERIAL DAN METODE

Sampel dan medium

Sampel jamur Aphyllophorales di koleksi dari Taman Nasional Bukit Tigapuluh Kec. Siberida Indragiri Hulu.Peremajaan dan pemeliharaan isolat menggunakan medium PDA. Seleksi aktivitas ligninolitik menggunakan medium *N-limited-RBB* (Lestan *et al*, 1996) yang telah dimodifikasi (Martina*et al*, 2004) dengan komposisi (g/l): indulin AT (lignin) 0,5g, RBB 0,2 g, $KH_2PO_4$0,2g, $CaCL_2.2H_2O$ 0,11g, NH_4NO_3 0,095g, $MnSO_47H_2O$ 0,05g, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,0425g, $MnSO_4.H_2O$ 0,035 g, $CoCl_2.6H_2O$ 0,007 g, $CuSO_4.5H_2O$ 0,007 g, $FeCl_3.6H_2O$ 0,0009 g, NaCl 0,00095 g, yeast ekstrak 0,2g, tween 80 0,05% dan H_2O_2 0,26 ml. dengan pH 4,5. Medium disterilkan dengan autoklaf. Thiamin HCl 0,25g/l yang telah disteril dengan membran filter dimasukkan ke medium N-Limited steril sebanyak 1%.

Uji aktivitas ligninolitik secara kualitatif

Isolat yang tumbuh pada medium PDA dipotong berukuran d 0,9 cm. Potongan diinokulasi ke medium N-Limited-RBB yang mengandung lignin dan diinkibasi selama 6 hari. Aktivitas ligninolitik dilihat melalui perubahan warna medium menjadi kuning. Rasio perbandingan diameter zona terang dengan diameter koloni (Rasio=Z/K) digunakan untuk melihat kemampuan aktivitas ligninolitik tiap isolat secara kualitatif. Isolat yang mempunyai aktivitas ligninolitik tertinggi dari uji kualitatif digunakan untuk uji kemampuan isolat mendegradasi lignin pada lindi hitam.

Pembuatan inokulum

Isolat yang mempunyai aktivitas ligninolitik tertinggi diinokulasi pada medium PDA dan diinkubasi selama 20 hari. Inokulum diperoleh dari mencampur akuades steril dengan miselium berspora untuk mendapatkan suspensi spora sehingga diperoleh jumlah 10^7spora/ml.

Biodegradasi lignin pada lindi hitam

Uji biodegradasi lignin pada lindi hitam menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu kecepatan agitasi dan waktu inkubasi. Medium N-limited sebanyak 50 ml yang mengandung lindi hitam 30% diinokulasi dengan spora isolat terpilih sebanyak 10^7spora/ml. Kultur diagitasi dengan kecepatan 0, 100, 150 dan 200 rpm pada suhu ruang. Setelah masa inkubasi 15, 20 dan 25 hari dilakukan pengukuran kadar lignin pada medium fermentasi. Pengukuran kadar lignin pada medium fermentasi menggunakan metode folin fenol pada panjang gelombang 700 nm (APHA,1995). Konsentrasi lignin diperoleh dengan memetakan nilai absorban pada kurva standar.Penentuan degradasi ligninpada medium fermentasi dihitung menggunakan persamaan :

% degradasi= [(X awal – X akhir)] / X awal x 100%

X = konsentrasi lignin

pH akhir medium fermentasi

Pengukuran pH dilakukan sesuai dengan masa inkubasi pada fermentasi. Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui perubahan pH selama proses fermentasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 14 isolat yang diuji, terdapat 3 isolat yang mempunyai aktivitas ligninolitik dengan potensi seperti terlihat pada Tabel 1. Isolat *Ganoderma* sp. BTA1 mempunyai aktivitas ligninolitik tertinggi pada uji kua-litatif. Hal ini terjadi karena isolat tersebut mampu menghidrolisis lignin menjadi senya-wa yang lebih sederhana yang dapat dilihat dari pembentukan zona perubahan warna pada medium. Enzim tersebut menguraikan lignin pada medium menjadi senyawa yang lebih sederhana (Pointing, 1999; Singh, 2006). Rasio aktivitas ligninolitik pada penelitian ini

lebih rendah daripada yang diperoleh Martina *et al.,* (2013) yaitu 2,75 yang dihasilkan oleh isolat RPL-33 dari ordo Aphyllophorales hasil isolasi dari tanah gambut.

Biodegradasi lignin pada lindi hitam

Kemampuan isolat *Ganoderma* sp. BTA1 dalam mendegradasi lignin dari lindi hitam yang diinkubasi pada berbagai kecepatan agitasi dapat dilihat pada Tabel 1. Penurunan lignin dalam lindi hitam sangat nyata dipengaruhi oleh kecepatan agitasi dan waktu inkubasi.Perlakuan interaksi antara kecepatan agitasi dan waktu inkubasi menghasilkan pengurangan lignin yang lebih besar dibanding tanpa interaksi.

Tabel 1. Rasio aktivitas ligninolitik isolat pada medium N-Limited-RBB inkubasi 6 hari

No.	Jenis isolat	Rasio aktivitas
1.	*Ganoderma* sp. BTA1	2,46
2.	AMS 27	2,22
3	*Stereum* sp.	1,91

Tabel 2. Penurunan konsentrasi lignin dalam lindi hitam (%) oleh *Ganoderma* sp. BTA1 pada medium *N-limited*pada suhu ruang

Kecepatan agitasi (rpm)	Waktu inkubasi (hari)			Rata-rata kecepatan agitasi
	15	20	25	
Kontrol	3,258^{h}	4,739^{h}	7,602^{g}	5,200^{d}
100	12,936^{f}	14,036^{ef}	16,026^{c}	14,333^{c}
150	22,860^{d}	26,970^{c}	33,488^{b}	27,773^{b}
200	22,510^{d}	25,477^{c}	45,786^{a}	31,258^{a}
Rerata waktu inkubasi	15,391^{c}	17,806^{b}	25,651^{a}	-

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf pada kolom yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji Duncan (DMRT) pada p=0,05

Tabel 3. pH medium mengandung lindi hitam yang diinokulasi *Ganoderma* sp. BTA1 pada suhu ruang

Kecepatan agitasi (rpm)	Waktu inkubasi (hari)			
	0	15	20	25
0	4,51	5,03	5,14	5,46
100	4,50	4,90	5,05	5,31
150	4,53	4,76	4,91	5,13
200	4,50	4,74	4,90	5,01

Kondisi optimal degradasi lignin pada lindi hitam adalah pada kecepatan agitasi 200 rpm waktu inkubasi hari ke 25 dengan penurunan konsentrasi lignin45,786%. Proses degradasi berlangsung secara optimal karena adanya pemberian oksigen yang tinggi dalam waktu yang cukup lama sebab *Ganoderma* sp BTA1 bersifat aerob. Agitasi memiliki peranan menyuplai kebutuhan oksigen pada organisme serta mensuspensi dan meratakan nutrisi yang dikandung dalam kultur cair. Hasil ini serupa ditemui pada *Phanerochaete chrysosporium* bahwa produksi salah satu enzim ligninolitik yaitu lignin peroksidase optimum pada agitasi 200 rpm (Alam*et al*.2009), sedangkan enzim lakase pada *Rhizoctonia praticola* juga optimum pada kecepatan agitasi 200 rpm (Janusz *et al*., 2006).

Degradasi lignin oleh *Ganoderma* sp. BTA1 pada lindi hitam dengan pemberian agitasi berlangsung lebih baik daripada tanpa agitasi (statik). Hal ini dapat disebabkan oleh pertumbuhan pelet pada kultur tanpa agitasi yang lebih rendah daripada pemberian agitasi sehingga aktivitas ligninolitik yang dihasilkan

lebih sedikit. D'Souza *et al.,* (1999) menyatakan bahwa produksi *lignin-modifying enzymes* pada *Ganoderma lucidum* umumnya sedikit dalam kultur statik. Erden *et al*., (2009) mendapatkan pada *Ganoderma carnosum*, kecepatan agitasi mempengaruhi produksi enzim ligninolitik Lac dan MnP.

Ganoderma sp. BTA1 mampu menurunkan lignin pada lindi hitam pada masing-masing perlakuan. Hal ini disebabkan isolat mampu melombak lignin menjadi senyawa lebih sederhana dengan mengekskre-sikan enzim ligninolitik ekstraseluler yaitu lakase (Lac), Mn-peroksidase (MnP) dan lignin peroksidase (LiP) yang memodifikasi dan menguraikan lignin (Baldrian ,2011). Namun tidak semua jamur menghasilkan ketiga enzim ini, *Lentinus polychrous* dan *Ganoderma lucidum*pada lindi hitam hanya menghasilkan lakase dan MnP (D'Souza, 1999; Budda, 2012).

Metabolisme lignin oleh *Ganoderma* sp. BTA1 menyebabkan perubahan pH pada lindi hitam (Tabel 2). Peningkatan pH terjadi sampai pada akhir masa inkubasi terutama pada perlakuan tanpa agitasi. Ada kecenderungan bahwa semakin kecil penurunan lignin maka kenaikan pH akan semakin tinggi, seperti yang terlihat pada perlakuan tanpa agitasi. Hal ini disebabkan bahwa lignin menghambat produksi asam pada jamur (Xiong *et al*., 2007). Kenaikan pH dapat diakibatkan dari metabolism nitrogen jamur dari *yeast* ekstrak sehingga terjadi penumpukan produk alkali seperti NH_3. Levin *et al.*, *(*2002) menyatakan bahwa kandungan N yang tinggi dapat menaikkan pH dan ini akan mempengaruhi kemampuan ligninolitik.

KESIMPULAN

Ganoderma sp. BTA1 mempunyai aktivitas ligninolitik yang tertinggi daripada isolat Aphylophorales lainnya. Pemberian agitasi dan waktu inkubasi mempengaruhi kemampuan *Ganoderma sp*.BTA1 dalam menurunkan konsentrasi lignin pada lindi hitam.Kemampuan degradasi lignin pada lindi hitam oleh *Ganoderma* sp.BTA1 optimal pada kecepatan agitasi 200 rpm dengan waktu inkubasi 25 hari yaitu sebesar 45,786%. Biodegradasi lignin pada lindi hitam oleh *Ganoderma* BTA1 meningkatkan pH medium fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

Alam, M. Z., Mansor, M. F., Jalal, K. C. A. (2009). Optimization of lignin peroxidase production and stability by *Phanero-chaete chrysosporium* using sewage-treatment-plant sludge as substrate in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial Microbiol. & Biotechnol*. 36(5), 757-764

American Public Health Association (APHA). (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA. Washington

Baldrian, P. (2011). Production of lingo-cellulolytic enzymes by mushrooms.-p.339-343. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7) 2011.Arcachon. France

Budda, W., Saranthima, R., Khammuang, S., Milintawisamai, N., Naknil, S. (2012). Ligni-nolytic enzymes of *Lentinus polychrous* grown on solid subtrates and its application in black liquor treatment. *Journal of Biological Sciences.* 12(1), 25-33.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modificationof lignin. In.t *J. Biochem. Mo. Biol*. 1(1), 36-50.

Dominic W., Wong, S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. Applied Biochemistry and Biotechno-logy**.**157(2), 174-209**.**

D'Souza, T. M., Merrith, C.S., Reddy, A. (1999). Lignin Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. and Environ. Micro-biol*. 65(12), 5307-5313.

Font X., Caminal, G., Gabarrell, X., Romero, S., Vicent, M. T. (2003). Black liquor detoxification by laccaseof *Trametes versicolor* pellets. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 78, 548-554.

Hossain, S. M., Anantharaman, N. M. D (2007). Studies on lignin biodegradation of wheat straw using *Trametes versicolor* snd *Lentinus critinus*. *Indians Electronic Journal*. 87, 42-50.

Janusz G., Rogalski, J., Barwinska, M., Szczodrak, J. (2006). Effect of culture conditions on production of extra-cellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish Journal of Microbiology*. 55(4), 309-319.

Kausik, P., Malik, A. (2009). Microbial decolourization of textile dyes through isolates obtained from contaminated sites. *Journal of Sci. & Industrial Research*. 68, 325-331.

Lestan, D., Strancar, A., Perdih, A. (1990). Influence of some oil and surfactans on ligninolitytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium. Appl. Microbiol. Biotech*. 34, 426-428.

Levin I, Forchiassin, F., Ramos, A.M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94, 377-383.

Martina, A. (2003). Aktivitas ligninolitik jamur Aphyllophorales strain lokal dari Taman Nasional Bukit Tigapuluh (TNBT) dengan menggunakan Poly R-478. Laporan Penelitian HEDS Project. Universitas Riau.

Martina, A., Devi, S. (2004). Kemampuan *Ganoderma sp*. strain lokal mendegradasi lignin pada beberapa konsentrasi lindi hitam. hlm. 225-233, di dalam Prosiding seminar UNRI-UKM ke 3. Universitas Riau. Pekanbaru

Martina A., Fibriarti, B.L., Roza, R.M., D. Zul, D. Sari, E.P. (2013). Isolasi dan seleksi kapang ligninolitik dari tanah gambut di desa Rimbo Panjang Kab. Kampar Propinsi Riau. Prosiding Semirata MIPA BKS PTN Barat. Universitas Lampung.

Paszczynski A., Crawford, R. L. (1995) Potential for bioremediation of xenobioticcompounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol.Prog*.11, 368-379.

Singh, H. (2006). Mycoremediation. Jhon Wiley and Sons, Inc: America.

Sivakumar R., Rajendran, R., Balakumar, C., Tamilvendan, M. (2010). Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(12), 7133-7141.

Sumathi S., Hung, Y. T. (2006). Treatment of pulp and paper mill wastes. hlm. 453-498. dalam *Waste Treatment in the Process Industries*. CRC Press. New York.

Tuomela, M. (2002). Degradation of lignin and other 14C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi. Dissertasion. Dept. of Applied Chem.and Microbiology. University of Helsinki.

Xiong Z., Zhang, X., Wang, H., Ma, F., Li, L. Li, W. (2007). Application of Brown-Rot Basidiomycetes *Fomitopsis* sp. IMER2 for biological treatment of black liquor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 104(6), 446-450.